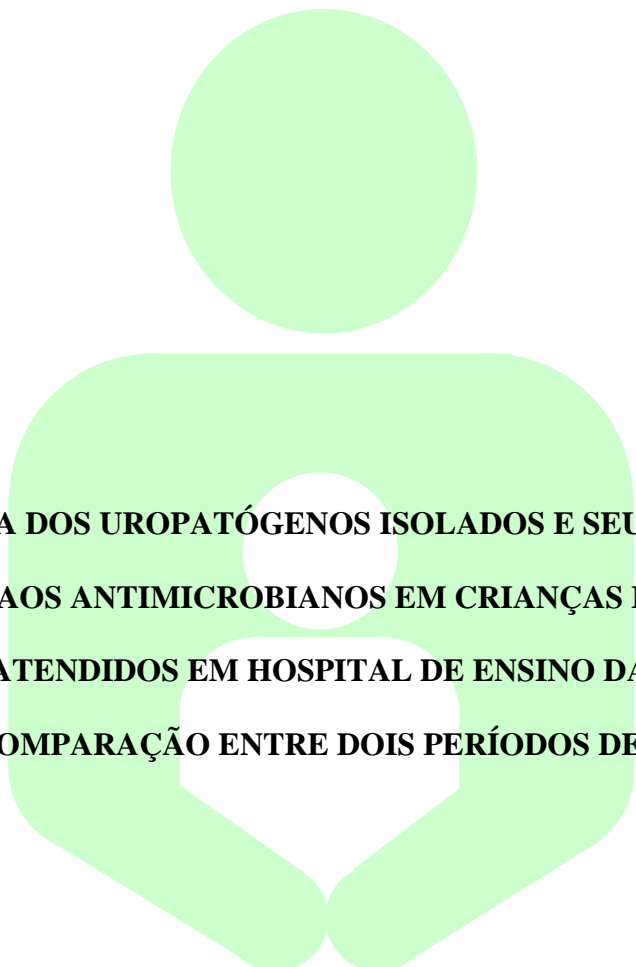


***INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROFESSOR FERNANDO FIGUEIRA***  
***PÓS- GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM SAÚDE MATERNO INFANTIL***  
***MESTRADO EM SAÚDE MATERNO INFANTIL***



**“FREQUÊNCIA DOS UROPATÓGENOS ISOLADOS E SEU PERFIL DE  
RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM CRIANÇAS MENORES DE  
CINCO ANOS ATENDIDOS EM HOSPITAL DE ENSINO DA CIDADE DO  
RECIFE: COMPARAÇÃO ENTRE DOIS PERÍODOS DE TEMPO”**

Mestranda: Roberta S. da Costa Pinto Meneses

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Maria Júlia G. de Mello

Co-orientador: Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup> Jailson de Barros Correia.

**Recife, 2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Agradecimentos

Ficha catalográfica  
Preparada pela Biblioteca Ana Bove  
Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP

---

M543f Meneses, Roberta S. da Costa Pinto  
Frequência dos uropatógenos isolados e seu perfil de resistência aos antimicrobianos em crianças menores de cinco anos atendidos em hospital de ensino da cidade do Recife: comparação entre dois períodos de tempo / Roberta S. da Costa Pinto Meneses. -- Recife: R. S. C. P. Meneses, 2010.

47 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós - Graduação Stricto Sensu em Saúde Materno Infantil – Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, IMIP.

Linha de Pesquisa: Estudos clínicos e epidemiológicos de doenças infecciosas na infância e adolescência.

Orientadora: Maria Júlia Gonçalves de Mello

Co-orientador: Jailson de Barros Correia

1. Infecções Urinárias. 2. Farmacorresistência Bacteriana. 3. Antiinfecciosos Urinários. 4. Lactente. 5. Pré-Escolar. I. Mello, Maria Júlia Gonçalves de, orientadora. II. Correia, Jailson de Barros, co-orientador. IV. Título.

NLM W4

---

## Agradecimentos

Ao recordar o caminho trilhado nestes dois últimos anos sinto-me compelida a lembrar das pessoas importantes que marcaram esta trajetória:

- ✚ Dos meus pais Roberto e Nilzete que com seu carinho e dedicação me estimularam e deram um exemplo vivo de retidão e sensatez; do meu irmão “Zinho” que sempre me apóia e acredita em mim;
- ✚ Do meu marido Alfredo que com seu amor e compreensão foi um porto seguro diante de todas as adversidades;
- ✚ Da amiga Iracy sempre pronta a ouvir e ajudar com sua amizade indelével;
- ✚ Dos meus orientadores Júlia e Jailson pela perfeição das palavras e vastidão dos ensinamentos;
- ✚ De Dr. Marcelo Pontual e Dr. José Pacheco mestres do saber da nefrologia pediátrica que tanto contribuíram para meu sucesso;
- ✚ Dos colegas da Nefrologia Pediátrica, do Hospital Helena Moura, da UTI Pediátrica e do mestrado em especial Roberto Casado por sua amizade e apoio durante toda esta jornada.

Neste ponto a memória falha, mas é certo que muitos outros nomes seriam importantes, então me permito agradecer a Deus e a Vida que transformaram um sonho em vontade e uma vontade em realidade.

**Mestranda:**

Roberta S. da Costa Pinto Meneses

**Função:**

Médica, graduada na Universidade de Pernambuco, residência em Pediatria Geral e especialização em Nefrologia Pediátrica no Instituto de Medicina Integrada Professor Fernando Figueira, Mestranda da 14ª turma do mestrado em Saúde Materno Infantil – IMIP.

**Local de trabalho:**

Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - Recife/PE, Hospital de Pediatria Helena Moura - Recife/PE.

**Telefone:** 81- 91929428

**E-mail:** [betacpm@yahoo.com.br](mailto:betacpm@yahoo.com.br)

**Orientador**

Maria Júlia Gonçalves de Mello

**Função:** Coordenadora do Setor de Controle de Infecção Hospitalar do IMIP, Tutora do curso de medicina da FPS (Faculdade Pernambucana de Saúde) e da Pós-graduação do IMIP

**Local de trabalho:** IMIP e FPS

**Telefone:** 81-87393427

**E-mail:** [jcorreiajmello@gmail.com](mailto:jcorreiajmello@gmail.com)

**Co-orientador**

Jailson de Barros Correia

**Função:** Diretor de Pesquisa do IMIP, Tutor da Pós-graduação do IMIP, Professor de Doenças Infecto-parasitárias em Pediatria do Hospital Universitário Oswaldo Cruz

**Local de trabalho:** IMIP

**Telefone:** 81-87446651

**E-mail:** [jcorreia@imip.org.br](mailto:jcorreia@imip.org.br)

**Linha de Pesquisa:**

Estudos Clínicos e Epidemiológicos de Doenças Infecciosas na Infância e Adolescência

**Local do desenvolvimento da pesquisa**

Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP

## Resumo

A infecção do trato urinário (ITU), problema frequente na pediatria, pode determinar cicatrizes renais, hipertensão arterial sistêmica e doença renal terminal. Nos últimos anos o aumento da resistência bacteriana tornou-se problema de saúde pública dificultando entre outras a escolha da terapia empírica adequada para tratamento da ITU. O objetivo deste estudo foi identificar os principais uropatógenos isolados em menores de cinco anos, a mudança do perfil de resistência aos antimicrobianos e propor terapia empírica baseado nos resultados obtidos. Estudo tipo corte transversal das uroculturas das crianças menores de cinco anos atendidas no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) em dois períodos (janeiro de 1999 a agosto de 2001 e janeiro a dezembro de 2008). Foram revisados resultados de uroculturas e considerou-se como positiva a urocultura com isolamento de um único micro-organismo com  $\geq 10^5$  UFC/cm<sup>3</sup>. As amostras de urina foram processadas em laboratório de microbiologia não automatizado e o antibiograma realizado pela técnica padronizada de difusão em disco de Kirby-Bauer. A distribuição dos micro-organismos e perfil de resistência aos antimicrobianos foram comparados entre os dois períodos utilizando-se teste do qui-quadrado. Foram analisados 4113 dos 6309 resultados das uroculturas realizadas e 601 foram consideradas positivas (14,6%). A distribuição dos isolados nos dois períodos foram respectivamente: *E.coli* (30% IC: 25,1-35,4 e 40,6% IC: 34,8-46,7), *Klebsiella spp* (27,2% IC: 22,5-32,5 e 24,5% IC: 19,5-30), outros Gram negativos (22% e 24,1%), Gram positivos (10,2% e 6,8%) e *Candida spp* (10,5% IC: 7,4-14,5 e 4% IC: 2,0-7,0). A resistência ao ácido nalidíxico entre as cepas de *E.coli* duplicou (23,7% e 52,8%) e triplicou entre os isolados de *Klebsiella spp*. (15,9% e 47,7%). Foi observado um aumento em sete vezes da resistência da *Klebsiella spp* ao ciprofloxacino, porém

cepas de *E.coli*, *Klebsiella spp* e *Pseudomonas spp*. apresentaram resistência ao ciprofloxacino inferior a 15% nos dois períodos. Observou-se decréscimo da resistência da *E.coli* à cefalosporina de primeira geração (CEF I), porém a resistência a este antimicrobiano foi superior a 30 % entre os Gram negativos isolados nos dois períodos. Em 2008, a resistência aos antimicrobianos observada nos isolados de *E.coli* foi por ordem decrescente: sulfametoxazol–trimetoprim (SMT-TMT 68%), ácido nalidíxico (50%), cefalosporina de primeira geração (30%), ciprofloxacino (15%) e nitrofurantoína (8%). De acordo com a análise da sensibilidade aos antimicrobianos dos microorganismos isolados no período de 2008, o uso de ciprofloxacino ou nitrofurantoína atingiria uma cobertura de 88% (IC95=83,4-91,6) e 75% (IC95=68,6-80,5) respectivamente, enquanto que o uso de CEF I ou ácido nalidíxico atingiria uma cobertura de aproximadamente 55%. O uso de SMT-TMT seria efetivo em apenas 35% (IC95= 29,6 a 41,5%). Ressalta-se a importância da urocultura colhida antes do início da terapia antimicrobiana para determinar o agente etiológico e a sensibilidade ao antimicrobiano e recomenda-se em menores de cinco anos a nitrofurantoína como terapia empírica na ITU devendo esta terapêutica ser ajustada após resultados do antibiograma. O ciprofloxacino seria indicado como terapia para ITU de difícil tratamento.

**DESCRITORES:** Infecções urinárias, Resistência bacteriana a antibióticos, Agentes anti-infecciosos urinários, /lactente, /pré – escolar.

## SUMÁRIO:

I. APRESENTAÇÃO .....	1
II. JUSTIFICATIVA .....	7
III. OBJETIVOS .....	8
IV. MÉTODOS .....	9
4.1. Desenho do estudo.....	9
4.2. Local do estudo .....	9
4.3. Período do estudo .....	9
4.4. População do estudo .....	10
4.5. Amostra .....	10
4.6. Critérios de elegibilidade .....	10
4.7. Procedimento para a seleção dos participantes .....	11
4.8. Definição e operacionalização das variáveis .....	12
4.9. Coleta de dados .....	13
4.10. Descrição de técnicas e procedimentos .....	13
4.11. Processamento e análise dos dados .....	14
4.12. Limitações metodológicas .....	14



4.13. Aspectos éticos .....	15
V. RESULTADOS .....	15
5.1. Artigo .....	16
VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	39
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
VIII. APÊNDICES .....	46
IX. ANEXOS .....	50

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** – Distribuição de percentual de uroculturas positivas e dos micro-organismos isolados em crianças menores de cinco anos de acordo com idade e sexo durante o período do estudo (1999-2001 e 2008) no IMIP.

**Tabela 2** – Distribuição de percentual de uroculturas positivas e dos micro-organismos isolados de crianças menores de cinco anos durante todo período do estudo (1999-2001 e 2008) no IMIP.

**Tabela 3** – Resistência aos antimicrobianos dos principais uropatógenos isolados em uroculturas de crianças menores de cinco anos durante o período do estudo (1999-2001 e 2008) no IMIP.

**Figura 1** - Comparação da cobertura obtida para os antimicrobianos utilizados como terapia empírica oral nos períodos de 1999-2001 e 2008 nas bactérias isoladas das uroculturas de crianças menores de cinco anos atendidas no IMIP.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEF I	cefalosporina de primeira geração
CEF III	cefalosporina de terceira geração
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa de Seres Humanos
DRCT	doença renal crônica terminal
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUA	Estados Unidos da América
HAS	hipertensão arterial sistêmica
IC 95%	Intervalo de confiança com 95% de probabilidade
IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
ITU	infecção do trato urinário
NAPRTCS	North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P.mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
RVU	refluxo vesico-ureteral
SMT-TMT	sulfametoxazol-trimetoprim
UFC/ cm <sup>3</sup>	unidades formadoras de colônias por centímetro cúbico

## **Apresentação:**

A infecção do trato urinário (ITU), problema frequente na faixa etária pediátrica, pode determinar a longo prazo cicatrizes renais, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e doença renal crônica terminal (DRCT) <sup>1,2</sup>. O conhecimento dos principais uropatógenos e do perfil de resistência aos antimicrobianos visando estabelecer um tratamento empírico adequado pode auxiliar na redução de dano renal permanente diminuindo as cicatrizes renais <sup>2,3,4</sup> sobretudo em crianças onde o rim está em desenvolvimento <sup>5</sup>. Problema de saúde pública mundial, a resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos, varia dependendo do local do estudo <sup>6,7</sup>. Demonstrar o aumento da resistência dos uropatógenos na última década visa além do mais, reforçar a necessidade de coleta da urocultura com a finalidade de orientar o uso adequado do antimicrobiano na criança com ITU <sup>6,7,8</sup>.

A ITU é definida classicamente pela presença de sintomas associados ao isolamento de micro-organismos na urina <sup>3,9</sup>. A verdadeira incidência da ITU é difícil de ser estimada <sup>2,10</sup> principalmente em lactentes, nos quais pode ser observada apenas febre sem sintomas específicos como disúria, urgência miccional, dor em baixo ventre ou em região lombar <sup>2,11,12,13</sup>. Essa faixa etária é mais susceptível ao dano renal já que o rim ainda está em desenvolvimento <sup>5</sup>.

Na Suécia, estudo prospectivo multicêntrico na década de 90, analisando o primeiro episódio de ITU em crianças menores de dois anos sem má- formação do trato urinário observou, para ambos os sexos, uma incidência em torno de 1,6% <sup>14</sup>. Nos Estados Unidos (Pensilvânia) em 1993, Hoberman *et al* , excluindo os recém-nascidos,

estudaram 945 crianças febris menores de um ano e verificaram uma prevalência de ITU em torno de 5% <sup>15</sup>. Ainda na Pensilvânia, foi realizado um estudo de coorte durante o período de julho de 2001 a maio de 2006 com crianças menores de seis anos sem má-formação do trato urinário ou outras co-morbidades, que detectou uma incidência de primeiro episódio de ITU menor que 1% <sup>16</sup>.

Na Nigéria, Musa-aisien *et al* realizaram um estudo prospectivo envolvendo crianças febris menores de cinco anos sem desnutrição, má-formação do trato urinário, síndrome de imunodeficiência adquirida ou uso prévio de antibióticos e observaram uma prevalência de ITU em torno de 9% <sup>17</sup>. Neste estudo não houve diferença estatisticamente significativa da prevalência entre crianças maiores ou menores de dois anos <sup>17</sup>. Em Taiwan, estudo prospectivo durante o período de setembro de 1997 a agosto de 1998, em crianças febris menores de oito semanas de idade, foi constatada uma incidência de ITU de 13,6%, porém não foi avaliada a presença de má-formação do trato urinário <sup>18</sup>. No Brasil, um estudo retrospectivo durante o período de janeiro de 2000 a dezembro de 2003, com resultados de uroculturas de adultos e crianças com até 13 anos de idade, em doze centros laboratoriais, o percentual de positividade de ITU para a faixa etária pediátrica foi de 10% <sup>19</sup>. Já no final da década de oitenta, a incidência de ITU foi aproximadamente 11% em estudo que envolveu crianças febris menores de dois anos atendidas na emergência pediátrica de um hospital universitário <sup>20</sup>.

A ITU está frequentemente associada ao refluxo vesicoureteral (RVU) <sup>13,14</sup>, porém outras situações como uropatias obstrutivas, hidronefrose, ureterocele, disfunção vesical e constipação intestinal aumentam o risco de sua recorrência predispondo ao aparecimento de cicatrizes renais <sup>2,13,21</sup>. Essas cicatrizes renais estão associadas a morbidades como retardo do crescimento renal, pielonefrite recorrente,

comprometimento na função glomerular, hipertensão arterial sistêmica precoce e por último DRCT que necessita de terapia renal substitutiva (tratamento dialítico ou transplante renal) <sup>5,12,22,23</sup>.

A doença renal crônica no estágio final é uma doença devastadora na infância e os pacientes que iniciam terapia dialítica têm uma expectativa de vida em torno de vinte anos, com mortalidade 30 a 150 vezes maior que a população pediátrica geral <sup>24</sup>. A prevalência da doença renal crônica em estágios iniciais é pouco conhecida, visto que a maioria destes pacientes é assintomática <sup>24</sup>. No entanto, a doença renal crônica terminal tem aumentado expressivamente em todo o mundo, principalmente nos pacientes adultos, sendo considerada um importante problema de saúde pública <sup>24</sup>. No Brasil, a DRCT tem aumentado sua incidência e elevado os custos para o Sistema Único de Saúde (cerca de 90% dos pacientes em tratamento dialítico são custeados pelo SUS) <sup>25</sup>. As principais causas registradas no NAPRTCS (North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies) para DRCT, em crianças dos países desenvolvidos, foram uropatias obstrutivas (22%), aplasia/hipoplasia/displasia renal (18%) e nefropatia do refluxo (8%), fatores estes que podem facilitar o desenvolvimento de ITU <sup>24</sup>.

O principal agente etiológico das ITU é a *Escherichia coli* (*E. coli*) <sup>8,11,17,20,26</sup>, porém em recém-nascidos que apresentaram refluxo vesicoureteral, foram isoladas bactérias Gram negativas diferentes da *E.coli* (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*) <sup>21</sup>. O *Streptococcus do grupo B* é pouco detectado no trato urinário, mas ocasionalmente pode estar relacionado com a ITU diagnosticada no período neonatal <sup>2,9</sup>. Apesar dos pacientes imunocomprometidos apresentarem ITU por germes oportunistas e vírus, a *E.coli* também é o agente mais frequentemente isolado nestes pacientes <sup>9</sup>. O *Staphylococcus aureus* está relacionado à contaminação através da

via hematogênica ou nos casos de urosepsis, resultante de obstrução do trato urinário ou cateterismo uretral <sup>9</sup>. A presença de *Staphylococcus aureus* na urina sugere infecção em outro sítio como osteomielite, abscesso renal ou endocardite bacteriana <sup>27</sup>. Estudo multicêntrico realizado em unidades de terapia intensiva envolvendo mais de 100.000 crianças e adolescentes até dezoito anos com infecção relacionada à assistência à saúde (hospitalar) observou que os uropatógenos mais frequentemente encontrados foram a *E.coli* e fungos, como a *Candida albicans* <sup>28</sup>.

A resistência é definida como a capacidade que o micro-organismo tem, ou adquire, para sobreviver e se multiplicar na presença de antimicrobianos <sup>29</sup> e determina maior morbidade, custos elevados com a assistência à saúde, tempo de permanência hospitalar prolongado além de alta mortalidade associada <sup>6</sup>. As bactérias apresentam diversos mecanismos para o desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos <sup>6,30</sup>. Isto pode acontecer através de um fenômeno genético no qual os genes contidos nos micro-organismos codificam diferentes mecanismos bioquímicos impedindo a ação das drogas <sup>6,30</sup>. Para apresentar resistência, as bactérias podem sofrer mutações cromossômicas, expressar um gene cromossômico latente, adquirir novo material genético através da troca direta do DNA (por conjugação) ou através de bacteriófagos, ou ainda adquirir diferente material pela transferência de genes situados no plasmídio por conjugação ou aquisição de DNA por transformação <sup>6,30</sup>. Estas informações codificadas no material genético permitem que as bactérias desenvolvam resistência aos antimicrobianos através de três principais formas: diminuição do acúmulo intracelular da droga, alteração do alvo da droga, e produção, por parte do micro-organismo, de enzimas que inativam ou diminuem a ação da droga <sup>6,29</sup>.

Em geral, a pressão seletiva exercida pelo uso excessivo ou inadequado de antimicrobianos, principalmente os de amplo espectro prescritos empiricamente, e o registro de dois ou mais internamentos hospitalares em um ano contribuem para o aumento da resistência bacteriana entre as crianças com ITU <sup>6,31,32,33</sup>. A antibioticoterapia profilática na ITU é considerada por alguns autores como um fator de risco para o aumento da resistência bacteriana <sup>16,32,33</sup>. Um estudo de coorte realizado nos EUA, durante o período de julho de 2001 a maio de 2006, verificou que o uso de antibiótico profilático não reduz o risco de recorrência da ITU, porém aumenta o risco de resistência bacteriana <sup>16</sup>. Bitsori *et al* observaram durante um período de 10 anos (1997 a 2007) que as enterobactérias responsáveis pela ITU apresentaram maior resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e que má-formação do trato urinário estava associado a este aumento de resistência <sup>34</sup>.

Estudos de diferentes continentes para avaliação da suscetibilidade bacteriana na ITU, demonstraram preocupante aumento da resistência à ampicilina, sulfametoxazol – trimetoprim (SMT-TMT), cefalosporina de primeira geração (CEF I) e fluorquinolonas, antibióticos classicamente prescritos de forma empírica <sup>8,19,26,35-38</sup>. Na Austrália, um estudo retrospectivo de janeiro a dezembro de 2000 com uroculturas colhidas na emergência pediátrica, de crianças menores de seis anos de idade, observou uma resistência da *E.coli* de 54% à ampicilina e amoxicilina, 16% à SMT-TMT e 23% à CEF I <sup>36</sup>. Em Taiwan, estudo retrospectivo entre janeiro de 1995 e dezembro de 2003, envolvendo crianças até 14 anos de idade durante o primeiro episódio de ITU, observou que cepas de *E.coli* apresentavam uma resistência de 82% à ampicilina e 55% ao SMT-TMT <sup>8</sup>. Em um estudo prospectivo realizado na Índia com recém-nascidos, crianças e adultos com suspeita de ITU, a *E.coli* apresentou uma resistência de 76% à ampicilina e



75% à SMT-TMT <sup>38</sup>. No Brasil, estudo retrospectivo envolvendo adultos e crianças maiores que dois anos de idade com suspeita de ITU, entre os anos de 2000 a 2003, o perfil de resistência da *E.coli* nos isolados das uroculturas foi 43% à ampicilina, 34% ao SMT-TMT e 14% à CEF I <sup>19</sup>.

Como o perfil de resistência dos uropatógenos aos antimicrobianos vem se modificando ao longo do tempo, a escolha empírica do antimicrobiano para o tratamento da ITU deve basear-se no conhecimento da microbiota local, de acordo com a faixa etária, na sensibilidade bacteriana e na gravidade clínica do paciente <sup>2,7,31</sup>.

O presente estudo tem como objetivo determinar, em crianças menores de cinco anos de idade, a prevalência dos uropatógenos e comparar o perfil de resistência aos antimicrobianos entre dois períodos de tempo com a finalidade de propor um tratamento empírico oral mais efetivo. Os resultados desse estudo serão apresentados sob a forma de artigo científico, formatado segundo as normas do Archives of Disease in Childhood.

## **Justificativa**

Na última década, o aumento da resistência aos antimicrobianos vem se destacando como um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A resistência aos antimicrobianos não se restringe à infecção relacionada à assistência à saúde, também estando presente nas infecções comunitárias. Reflexo de uma tendência global, independente da faixa etária estudada, o aumento de resistência é observado nos uropatógenos, sobretudo enterobactérias responsáveis pelas infecções do trato urinário. A falta de adesão dos profissionais de saúde às medidas recomendadas para o uso adequado de antimicrobianos é um dos fatores que aumentam esta resistência. A detecção dos germes mais prevalentes nas crianças até cinco anos de idade, bem como a comparação do perfil de resistência aos antimicrobianos entre os dois períodos do estudo com intervalo de dez anos, poderá orientar um tratamento empírico oral mais efetivo para ITU nesta faixa etária. Com o rim ainda em desenvolvimento, nos pacientes pediátricos esta conduta pode atuar como uma das medidas preventivas na evolução para DRCT, uma vez que o retardo no diagnóstico e tratamento da ITU bem como o uso de antimicrobiano inadequado são fatores que facilitam o aparecimento de cicatrizes renais que podem determinar a instalação de doença renal crônica terminal.

## **Objetivos:**

### **Objetivo geral:**

Determinar a frequência e comparar o perfil da resistência aos antimicrobianos dos uropatógenos isolados em uroculturas de crianças menores de cinco anos de idade, atendidas em hospital de ensino da cidade do Recife, entre dois períodos de tempo.

### **Objetivos específicos:**

Em crianças menores de cinco anos com uroculturas positivas durante o período de janeiro de 1999 a agosto de 2001 e janeiro a dezembro de 2008:

- 3.1. Determinar a frequência e comparar a distribuição dos uropatógenos isolados;
- 3.2. Determinar e comparar o perfil da resistência aos antimicrobianos dos uropatógenos mais frequentes nos dois períodos do estudo;
- 3.3. Avaliar a sensibilidade dos diferentes micro-organismos para cada antimicrobiano e propor esquema empírico oral com melhor cobertura.

## **Métodos:**

### **4.1. Desenho do estudo**

Foi realizado um estudo tipo corte transversal em dois períodos de tempo com avaliação dos resultados das uroculturas de crianças menores de cinco anos.

### **4.2. Local do estudo**

O estudo foi realizado com dados do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Recife – Pernambuco, entidade privada sem fins lucrativos, centro nacional de referência para diversos programas como o de Assistência Integral à Saúde da Mulher e da Criança do Sistema Único de Saúde. O serviço de Nefrologia Pediátrica do IMIP foi fundado em 1963 por Dra. Helena Moura. Um estudo não publicado realizado no Recife, na Unidade Renal Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), no período de 1993 a 2006 (Dr. José Pacheco Ribeiro Neto, comunicação pessoal), observou-se que a ITU, em pacientes sem má formação do trato urinário, foi a quarta causa associada ao desenvolvimento de DRCT.

### **4.3. Período do estudo**

As uroculturas deste estudo foram coletadas nos períodos de janeiro de 1999 a agosto de 2001 e janeiro a dezembro de 2008.

#### **4.4. População do estudo**

Foram analisados os resultados de uroculturas de crianças menores de cinco anos de idade atendidas no IMIP.

#### **4.5. Amostra**

Para o cálculo da amostra foi feito estudo piloto para avaliar o percentual de positividade de urocultura no período de um ano. Para uma positividade estimada de aproximadamente 10% seria necessário obter em torno de 7.000 resultados de uroculturas nos dois períodos do estudo <sup>17,39</sup>.

A partir dos resultados foram pesquisados a idade e sexo dos pacientes, a positividade da urocultura, micro-organismo isolado e antibiograma obtido, com a finalidade de avaliar e comparar a evolução da resistência bacteriana nos dois períodos.

#### **4.6. Critérios de elegibilidade**

Foram revisados os resultados das uroculturas realizadas e registradas nos livros do laboratório de bacteriologia clínica do IMIP.

##### 4.6.1. Critérios de inclusão:

- uroculturas registradas no laboratório e realizadas em crianças menores de cinco anos.

##### 4.6.2. Critério de exclusão:

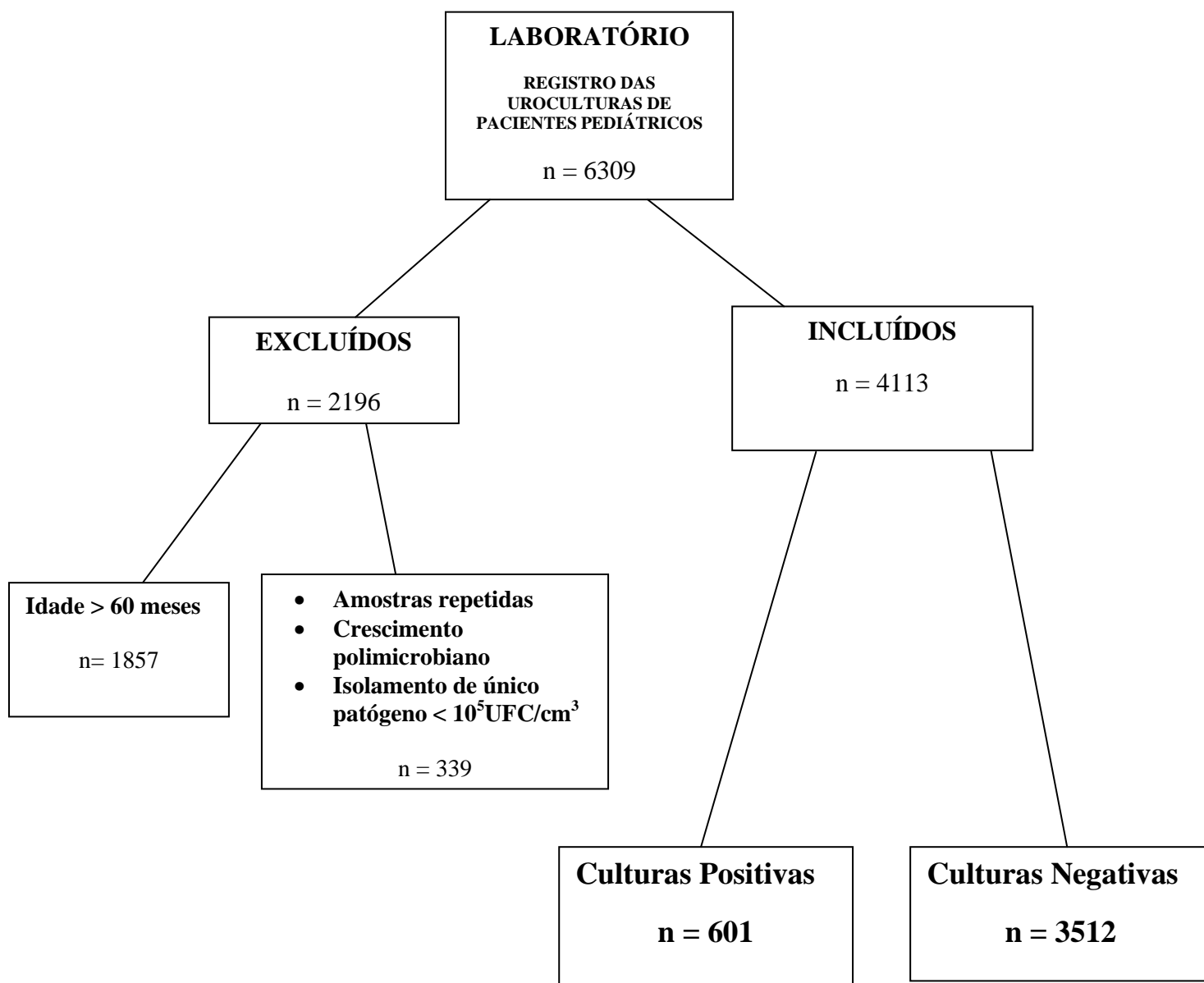
- Amostras repetidas de uroculturas do mesmo paciente coletadas em intervalo de tempo inferior a 30 dias. Foram excluídas uroculturas positivas com isolamento do mesmo agente etiológico exceto quando houve modificação da sensibilidade

aos antimicrobianos ou isolamento de microrganismo de sub-espécie ou espécie diferente.

- Urocultura com isolamento de único patógeno com contagem de colônias menor de  $10^5$ UFC/cm<sup>3</sup> ou crescimento polimicrobiano independente da contagem de colônias.

#### 4.7. Procedimentos para seleção dos participantes

Através do registro nos livros do laboratório de bacteriologia do IMIP foram identificados os pacientes do estudo de acordo com os critérios de elegibilidade (lista de checagem - apêndice 1).



#### **4.8. Definição e operacionalização das variáveis**

**Idade:** variável numérica contínua expressa em meses, de acordo com a informação do prontuário a partir da data do nascimento e a data da coleta do exame da urocultura.

**Sexo:** variável nominal dicotômica categorizada em masculino e feminino.

**Urocultura:** definida como semeio de urina em meio de cultura para avaliar crescimento de micro-organismo. Foi considerado **urocultura positiva** o crescimento de apenas um único patógeno com valor maior ou igual a 100.000 UFC/ cm<sup>3</sup>. Considerou-se **urocultura negativa** ausência de crescimento bacteriano.

**Micro-organismo isolado:** a identificação dos micro-organismos foi realizada em laboratório de microbiologia não automatizado, de acordo com as recomendações dos procedimentos padrões de diagnóstico laboratorial preconizadas no “ Manual de Microbiologia para Controle de Infecção em Serviços de Saúde da ANVISA” <sup>40</sup>. É uma variável categórica nominal policotômica. Os micro-organismos mais frequentemente isolados para ITU na literatura são: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter sp*, Bacilos não fermentadores, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus* do grupo B e *Candida spp* <sup>2,17,19,35</sup>.

**Teste de sensibilidade aos antimicrobianos ou antibiograma:** as cepas bacterianas foram consideradas sensíveis ou resistentes a determinado antimicrobiano pelo método de Kirby - Bauer. É uma variável categórica nominal dicotômica <sup>41</sup>.

#### **4.9. Coleta de dados**

Foram revisados os resultados dos exames bacteriológicos de urina através dos registros nos livros do laboratório do IMIP. A coleta de informações dos pacientes com urocultura positiva foi realizada a partir do sistema de informática do hospital preenchendo um formulário pré-estabelecido (apêndice 2).

#### **4.10. Descrição de técnicas e procedimentos**

O IMIP dispõe de um laboratório de bacteriologia não automatizado, as amostras foram semeadas em meio de cultura diferencial ágar CLED (meio contendo Lactose e L-cistina com Azul de bromotimol para melhor diferenciação das colônias) e ágar Sabouraud com cloranfenicol para crescimento de bactérias e fungos respectivamente. As técnicas laboratoriais utilizadas para identificação microbiana e para realização do antibiograma por difusão em disco foram preconizados pelo Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Hospitalar da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e pelo Manual de Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão (Kirby–Bauer) do CLSI <sup>40,41</sup>. Os antimicrobianos analisados no estudo correspondem aos testados no laboratório de bacteriologia nos dois períodos do estudo: ciprofloxacino (CIPRO), ácido nalidíxico, nitrofurantoína, gentamicina, amicacina, CEF I (cefalotina), cefalosporina de terceira geração (CEF III ceftriaxona/ceftazidime), SMT-TMT, piperacilina-tazobactam e meropeném. Para determinar o perfil de sensibilidade, as cepas bacterianas são consideradas sensíveis ou resistentes a determinado antimicrobiano segundo técnica padronizada pela determinação do halo de inibição do crescimento bacteriano <sup>41</sup>.



#### **4.11. Processamento e análise dos dados**

O banco de dados, com dupla entrada, construído no programa Epi-Info v. 3.5 foi utilizado para a análise, elaboração de tabelas e gráficos. Para verificar a diferença de resistência aos antimicrobianos nos dois períodos do estudo foi utilizado o teste de qui-quadrado e quando necessário, o teste exato de Fisher considerando o nível de significância de 5%. Para estabelecer o cálculo da cobertura da terapia empírica oral foram excluídas as infecções fúngicas e os isolados de bactéria que não foram testados para o antimicrobiano considerado. Para cada antimicrobiano foi verificada a sensibilidade de todos os isolados de diferentes espécies em cada um dos dois períodos do estudo e feita a comparação utilizando o teste de qui-quadrado.

#### **4.12. Limitação metodológica**

Estudos de corte transversal e avaliação dos dados de forma retrospectiva apresentam limitações que devem ser ressaltadas. O estudo analisou os resultados das uroculturas sem que fosse possível obter dados detalhados dos pacientes. Não foi possível determinar que tipo de infecção o paciente apresentava (ITU comunitária ou relacionada à assistência à saúde), se era primeiro episódio ou infecção recorrente, se era ITU complicada ou não complicada ou se havia mais de um internamento por ano. Não foi possível avaliar as características do sistema urinário do paciente (presença de refluxo vesico-ureteral, má formação do trato urinário) bem como se o paciente havia feito uso de antimicrobiano prévio ou antibioticoterapia profilática mesmo sabendo que todos estes fatores podem alterar o perfil de resistência bacteriana<sup>6,16,21,28,32,33,35</sup>. O local do estudo também corresponde a uma limitação importante no estudo por ser um hospital terciário para pediatria podendo determinar um viés de seleção uma vez que casos

graves de ITU são encaminhados para este serviço. Isto pode determinar um maior percentual de uropatógenos multirresistentes. No entanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a modificação do perfil de resistência dos uropatógenos aos antimicrobianos e como este se modificou entre os dois períodos estudados utilizando os mesmos critérios de inclusão e de análise. Com estes resultados poderemos auxiliar na escolha empírica oral mais adequada para início precoce do tratamento da ITU, pois o seu retardo facilita o aparecimento de cicatrizes renais, que podem evoluir para dano renal permanente com consequente instalação de DRCT<sup>2,4,22</sup>.

#### **4.13. Aspectos éticos**

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP (CEP), e seguiu as recomendações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde<sup>42</sup> (Protocolo nº1338). Foi concedida dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo CEP, uma vez que foi realizada uma avaliação retrospectiva dos resultados nos livros de bacteriologia o que impossibilitava encontrar todos os pacientes durante os dois períodos do estudo, já que em sua maioria residiam no interior do estado e não se encontravam em seguimento no hospital. Foi resguardada a confidencialidade dos dados coletados durante a pesquisa.

## **V. Resultados**

Os resultados serão apresentados sob a forma de artigo enviado para a revista Archives of Disease in Childhood (Anexo 1-Instruções para os autores e Anexo 2 – confirmação do envio).

## VII. Referências Bibliográficas

1. American Academy of Pediatrics. Committee on Quality Improvement. Subcommittee on Urinary Tract Infection. Practice parameter: the diagnosis, treatment, and evaluation of the initial urinary tract infection in febrile infants and young children. *Pediatrics* 1999; 103:843-852.
2. Schlager TA. Urinary tract infections in infants and children. *Infectious Disease Clinics of North America* 2003; 17:353-365.
3. Larcombe J. Clinical evidence: urinary tract infection in children. *BMJ* 1999; 319:1173-1175.
4. Ransley PG, Risdon RA. Reflux nephropathy: effects of antimicrobial therapy on the evolution of the early pyelonephritic scar. *Kidney International* 1981; 20: 733-742.
5. Zorc JJ, Kidoo D, Shaw KN. Diagnosis and management of pediatric urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 18:417-422.
6. Shlaes DM, Gerding DN, John JrJF, Craig WA, Bornstein DL, Duncan RA, et al. Society for healthcare epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the prevention of antimicrobial resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1997; 18:275-91.
7. Sharifian M, Karimi A, Tabatabaei SR, Anvaripour N. Microbial sensitivity pattern in urinary tract infections in children: a single center experience of 1.177 urine cultures. *Jpn. J. Infection Disease* 2006; 59:380-82.

8. Wu CY, Chiu PC, Hsieh KS, Chiu CL, Shih CH, Chiou YH. Childhood urinary tract infection: a clinical analysis of 597 cases. *Acta Paediatrica Taiwan* 2004; 45:328-333.
9. Ma JF, Shortliffe LMD. Urinary tract infection in children: etiology and epidemiology. *Urologic Clinics of North America* 2004; 31:517-526.
10. Jakobsson B, Esbjörner E, Hansson S. Minimum incidence and diagnostic rate of first urinary tract infection. *Pediatrics* 1999; 104:222-226.
11. Shaw KN, Gorelick M, McGowan KL, Yakscoe NM, Schwartz JS. Prevalence of urinary tract infection in febrile young children in the emergency department. *Pediatrics* 1998; 102:1-5.
12. Alper BS, Curry SH. Urinary tract infection in children. *American Academy of Family Physicians* 2005: 2483-2488.
13. Macedo CS, Bastos HD, Riyuzo MC. Renal scars in children with primary vesicouretral reflux. *Jornal de Pediatria* 2003; 79:355-62.
14. Hasson S, Bollgren I, Esbjörner E, Jakobsson B, Marild S. Urinary tract infections in children below two years of age: a quality assurance project in Sweden. *Acta Paediatrica* 1999; 88:270-4.
15. Hoberman A, Chao HP, Keller DM, Hickey R, Davis HW, Ellis D. Prevalence of urinary tract infection in febrile infants. *The Journal of Pediatrics* 1993;123:17-23.

16. Conway PH, Cnaan A, Zaoutis T, Henry BV, Grundmeier RW, Keren R.  
Recurrent urinary tract infection in children: risk factors and association with prophylactic antimicrobials. *JAMA* 2007; 298:179-186.
17. Musa-Aisien AS, Ibadin OM, Ukoh G, Akpede GO. (2003). Prevalence and antimicrobial sensitivity pattern in urinary tract infection in febrile under-5s at a children's emergency unit in Nigeria. *Annals of Tropical Paediatrics* , 23, 39-45.
18. Lin DS, Huang SH, Lin CC, Tung YC, Huang TT, Chiu NC, et al. Urinary tract infection in febrile infants younger than eight weeks of age. *Pediatrics* 2000; 105: 1-4.
19. Kiffer CR, Mendes C, Oplustil CP, Sampaio JL. Antibiotic resistance and trend of urinary pathogens in general outpatients from major urban city. *International Brazilian Journal of Urology* 2007; 33:42-9.
20. Goldraich NP, Manfroi A. Febrile urinary tract infection: *Escherichia coli* susceptibility to oral antimicrobials. *Pediatric Nephrology* 2002; 17:173-176.
21. Kanellopoulos TA, Salakos C, Spiliopoulou I, Ellina A, Nikolapoulou NM, Papanastasiou DA. First urinary tract infection in neonates, infants and young children: a comparative study. *Pediatric Nephrology* 2006; 21:1131-1137.
22. Orellana PB, Cavagnaro FSM, Banquedano PD, Lagomarsino EF, García CB, Villaruel L, et al. Factores de riesgo de daño renal permanente en niños con infección del tracto urinario. *Revista Médica de Chile* 2002; 130:1147-1153.

23. Smellie JM, Prescod NP, Shaw PJ, Risdon RA, Bryant TN. Childhood reflux and urinary infection: a follow up of 10-41 years in 226 adults. *Pediatric Nephrology* 1998; 12:727-736.
24. Warady A.B, Chadha V. Chronic kidney disease in children: the global perspective. *Pediatric Nephrology* 2007; 22:1999-2009.
25. SBN. [www.sbn.org.br](http://www.sbn.org.br) Acesso em 03 de março de 2010 em Censo ano 2008.
26. Storby K.A., Österlund A, Kahlmeter G. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* in urine samples from children and adults: a 12 year analysis. *Acta Paediatrica* 2004; 93:487-491.
27. Schlager TA. Urinary Tract Infections in children younger than 5 years of age. Epidemiology, diagnosis, treatment, outcomes and prevention. *Paediatric Drugs* 2001; 3:219-227.
28. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP, National Nosocomial Infections Surveillance System. Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States. *Pediatrics* 1999;103:39-46.
29. CDC. (s.d.). [www.cdc.gov/nicdod/aip/research/ar.html](http://www.cdc.gov/nicdod/aip/research/ar.html). Acesso em 07 de agosto de 2008, disponível em: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)
30. Tavares, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2000; 33(3): 281-301.
31. Sotto A, Boever CM, Fabro-Peray P, Gouby A, Sirot D, Jourdan J. Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with

urinary tract infections: a prospective study. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;438-44.

32. Allen UD, MacDonald N, Fuite L, Chan F, Stephens D. Risk factors for resistance to "first-line" antimicrobials among urinary tract isolates of *Escherichia coli* in children. *Canadian Medical Association* 1999; 160:1436-40.
33. Marcus N, Ashkenazi S, Samra Z, Cohen A, Livni G. Community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections in children hospitalized in a tertiary center: relative frequency, risk factors, antimicrobial resistance and treatment. *Infection* 2008; 36:421-426.
34. Bistori M, Maraki S, Kalmanti M, Galanakis E. Resistance against broad-spectrum  $\beta$ -lactams among uropathogens in children. *Pediatric Nephrology* 2009; 24:2381-2386.
35. Prelog M, Schiefecker D, Fille M, Wurzner R, Brunner A, Zimmerhackl LB. Febrile urinary tract infection in children: ampicillin and trimethoprim insufficient as empirical mono-therapy. *Pediatric Nephrology* 2008; 23:597-602.
36. Mehr SS, Powell CVE, Curtis N. Cephalosporin resistant urinary tract infections in young children. *J. Peadiatric Child Health* 2004; 40:48-52.
37. Haller M, Brandis M, Berner R. Antibiotic resistance of urinary tract pathogens and rationale for empirical intravenous therapy. *Pediatric Nephrology* 2004; 19: 982-86.



38. Akram M, Shahid M, Khan AU. Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in JNMC Hospital Aligarh, India. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2007; 6:4.
39. Bercion R, Mossoro-Kpinde D, Manirakiza A, Faou AL. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* uropathogens in Bangui, Central African Republic . *Journal Infection Developing Countries* 2009; 3: 187-190.
40. ANVISA (s.d.) [www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/manuais.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/manuais.htm) Acesso em 28 de julho de 2008, disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Manual de microbiologia clínica para controle de infecção em serviços de saúde.
41. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition
42. Brasil. Ministério Nacional da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. *Bioética* 1996; 4:S15-S25

# **Antimicrobial resistance in uropathogens in children from Brazil**

*Authors:*

Roberta Souza da Costa Pinto Meneses <sup>1</sup>

Maria Júlia Gonçalves de Mello <sup>1,2</sup>

José Pacheco Martins Ribeiro Neto <sup>1,2</sup>

Jailson B. Correia <sup>1,3</sup>

*Affiliations:*

<sup>1</sup> Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP

<sup>2</sup> Faculdade Pernambucana de Saúde

<sup>3</sup> Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco

*Corresponding author:*

Dr Maria Júlia Gonçalves de Mello, MD PhD

Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP

Word count (abstract): 239

Word count (text): 2353

**Artigo original formatado para o Archives of Disease in Childhood**

## ABSTRACT

**Objectives:** to describe pathogens and their antimicrobial resistance in urine cultures of children less than five years of age with urinary tract infections.

**Design:** cross sectional study comparing an earlier (January 1999 to August 2001) and a later (January to December 2008) period of time.

**Setting:** Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), a teaching hospital with pediatric nephrology services (Recife, Brazil).

**Patients:** children aged less than five years with suspected urinary tract infection provided 4113 eligible urine cultures.

**Interventions:** none.

**Main outcome measures:** urine culture positivity rate, pathogen species; antimicrobial resistance (Kirby-Bauer diffusion disks).

**Results:** 601 (15%) cultures were positive. The most frequent isolates in the earlier and later periods were, respectively: *E. coli* (30% and 41%), *Klebsiella* spp (27% and 25%), *P. aeruginosa* (5% and 9%), *P. mirabilis* (7% and 7%) and *Candida* spp. (11% and 4%). In 2008, the resistance of *E.coli* was (in descending order): co-trimoxazole (68%), nalidixic acid (52%), first generation cephalosporin (30%), ciprofloxacin (15%) and nitrofurantoin (8%). When all pathogens are considered, the highest antimicrobial coverages would be reached by ciprofloxacin (88%, CI95% = 83.4 to 91.6%) and nitrofurantoin (75%, CI95% = 68.6 to 80.5 %).

**Conclusions:** Nitrofurantoin and ciprofloxacin are viable alternatives, respectively for uncomplicated and complicated urinary tract infections. Trends of antimicrobial resistance should be monitored at the local level because changes occur over time. Further prospective studies should address empiric antibiotic coverage according to resistance risk profile.

**Keywords:** Urinary tract infections, bacterial resistance to antibiotics, anti-infective agents urinary / infant / pre-school.

## INTRODUCTION

Urinary tract infection (UTI) is a frequent problem in pediatric patients. Estimates of the prevalence of UTI in children vary from 1.5 to 7.5%, depending on age, gender and setting<sup>1-4</sup>. UTI can cause long term morbidity such as renal scarring, hypertension and end stage renal disease and this is particularly important in infants, who have a higher risk of renal damage because the kidney is still developing<sup>1,5</sup>. To prevent urosepsis and reduce the risk of renal scarring, empirical antibiotic treatment is often started soon after the collection of urine specimens for culture and should be based on the epidemiology of uropathogens and their antimicrobial susceptibility profiles<sup>5,4</sup>.

Although *Escherichia coli* is by far the commonest causative organism in all age groups<sup>3,7-9</sup>, certain conditions like vesicoureteral reflux, congenital malformations and healthcare associated infections increase the relative frequency of other Gram-negative bacteria such as *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* or *P. vulgaris* or even fungi<sup>10,11,12</sup>. Moreover, antimicrobial resistance in uropathogens has been increasing over time, to the extent that its prevention has been recently declared a global priority<sup>13</sup>. For instance, studies conducted in the pediatric population have shown progressively increased resistances to commonly prescribed antimicrobials like ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole (SMT-TMT), first generation cephalosporins (CEF I) and fluoroquinolones<sup>9,14-16</sup>.

While the occurrence of recurrent infections and conditions requiring prophylactic antibiotic therapy are established risk factors for increased resistance<sup>17,18</sup>, susceptibility profiles vary widely across settings and over time<sup>9,10,12,14,19-21</sup>. This

reinforces the need for studies describing local flora according to age, bacterial susceptibility and clinical severity to inform empirical antimicrobial choice <sup>1,22</sup>.

This study aims to describe the main uropathogens isolated in urine cultures of children with less than five years of age, to assess changes in antimicrobial resistance by comparing two periods of time (almost ten years apart) and to propose oral empiric therapy in a Tertiary Health Service in Recife, Brazil.

## METHODS

Reports of urine cultures from children with less than five years of age were retrospectively reviewed in two periods of time: from January 1999 to August 2001 and from January to December 2008. This cross sectional study was carried out at the Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), a general teaching hospital with specialized pediatric nephrology service located in Recife, northeast of Brazil.

Urine specimens were collected by midstream catch or transurethral bladder catheterization according to the hospital guidelines. Urine cultures with a growth of less than  $10^5$  colony-forming units (CFU)/cm<sup>3</sup> of a single pathogen, those with multiple bacterial or fungal growth and those collected within 30 days from the same patient (except when the isolated micro-organism or the antibiotic sensitivity pattern changed) were excluded. Cultures were considered negative when no growth was seen and positive when there was a growth of  $\geq 10^5$  CFU/cm<sup>3</sup> of a single pathogen.

Urine samples were processed in a non-automated microbiology laboratory. Samples were placed in Cystine, Lactose, Electrolyte-Deficient (CLED) and Sabouraud agar for bacteria and fungi, respectively. Laboratory procedures for microbial identification and antimicrobial susceptibility by Kirby-Bauer disk diffusion followed national and international recommendations<sup>41,24</sup>. Ciprofloxacin (CIPRO), nalidixic acid, nitrofurantoin, gentamicin, amikacin, CEF I (cephalothin), third-generation cephalosporins (CEF III ceftriaxone / ceftazidime), SMT-TMT, piperacillin-tazobactam and meropenem were tested in the two study periods. Bacterial strains were considered

susceptible or resistant according to the size of their inhibition zones <sup>41</sup>. To describe each antibiotic for coverage of susceptible uropathogens, fungi and non-tested isolates were excluded and all others were grouped together for each period of time.

Epi-Info software v.3.5 was used for statistical analysis. Chi-square or Fisher's exact test were used to compare categorical variables and results were considered statistically significant when  $p$  value was  $< 0.05$ . The study was approved by IMIP's Research Ethics Committee (Protocol Number 1338).



## RESULTS

In the two study periods, a total of 4452 urine samples from children under five years of age were sent to the bacteriology laboratory. As 339 cultures were excluded due to any of the reasons above mentioned in the Methods section, there were 4113 eligible cultures. The urine cultures came from 2138 (52%) children younger than 24 months (1139 male) and 1975 (48%) from children aged 24 until 60 months (942 males). There were 18% (199/1139) positive urine samples from male and 15% (146/999) from female children younger than 24 months. In children aged 24 until 60 months, there were 11% (101/942) positive urine cultures from males and 15% (155/1033) from females ( $p = 0.004$ ). The distribution of pathogens by age and gender is shown in Table 1.

In the two study periods, a total of 601/4113 (15%) urine cultures were positive, 323 from the 1999/2001 period and 278 from 2008 (table 2). The most common uropathogen in the two study periods was *E.coli*. The frequency and distribution of the different micro-organisms isolated in 1999/2001 and 2008 were respectively: *E. coli* (30% and 40.6%), *Klebsiella spp.* (27.2% and 24.5%), *P.aeruginosa* (5.3% and 9.4%), *P.mirabilis* (6.5% and 6.8%), other Gram negatives (10.2% and 7.9%), Gram positives (10.2% and 6.8%) and *Candida spp.* (10.5% and 4%). When the two periods are compared, the difference in distribution was statistically significant for *E. coli*, *P. aeruginosa* and *Candida spp.* (Table 2).

Resistance rates of specific uropathogens in the two periods are shown in table 3. Within 10 years, *E. coli* isolates showed an increased resistance to nalidixic acid from

24% in early 1999/2001 to 52% in 2008 ( $p < 0.001$ ). No change was observed in the resistance to ciprofloxacin (4% and 15%,  $p = 0.06$ ) and SMT-TMT (78% and 69%,  $p = 0.14$ ). Decreasing resistance was registered to nitrofurantoin (20% and 8%,  $p = 0.014$ ) and CEF I (62% and 32%,  $p < 0.001$ ). Strains of *Klebsiella spp.* showed an increase in resistance to nalidixic acid (16% and 48%,  $p < 0.001$ ) and ciprofloxacin (2% and 15%,  $p = 0.015$ ), but there was no variation in resistance to CEF I, nitrofurantoin, SMT-TMT and gentamicin. Isolates of *P. aeruginosa* showed decreased resistance to antipseudomonal third generation cephalosporin ceftazidime ( $p < 0.001$ ) but no changes in nitrofurantoin and ciprofloxacin ( $p = 0.52$ ). *P. mirabilis* did not modify the resistance to nalidixic acid, CEF I, CEF III - ceftriaxone and SMT-TMT. Other Gram positive isolates in both periods did not show any changes in resistance to SMT-TMT ( $p = 0.65$ ) and CEF I ( $p = 0.13$ ).

Figure 1 shows the empiric coverage obtained with specific antimicrobials in the two study periods. According to *in vitro* sensitivity patterns of grouped bacterial isolates, the use of SMT-TMT would only cover around a third of cases of UTI, with no significant changes between the study periods. On the other hand, both nalidixic acid and ciprofloxacin coverage significantly decreased while coverage by first generation cephalosporin and nitrofurantoin increased between the earlier and later study periods. In the most recent period (2008), the highest antimicrobial coverages would be reached by ciprofloxacin (88%, CI95% = 83.4 to 91.6%) and nitrofurantoin (75%, CI95% = 68.6 to 80.5 %).

## DISCUSSION

In this study of urine cultures from children with less than five years of age from a tertiary hospital in northeast Brazil we found that *E. coli*, as expected, was the predominant pathogen. We found high rates of *Klebsiella spp.* (around one in every four positive cultures) and that *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* and *Candida spp.* were also frequently isolated. We found high rates of antimicrobial resistance in bacterial isolates and these rates changed over time, leading to significant modifications in the coverage of antimicrobials commonly prescribed as empiric therapy.

The prevalence of *E. coli* in urines from children aged less than five years varies in some series between 54 and 86%<sup>9,20,25,26</sup>. Compared to these, in our study, albeit predominant, *E. coli* relative frequency was low in both study periods (30 and 41%) follow by *Klebsiella spp.* (27 and 24%). This is more likely to be due to an over representation of other agents in our series, as most previous studies excluded children with urinary tract malformations (known to be associated to a wider myriad of pathogens) and we did not<sup>9,12,20,21,25,26</sup>. This effect seemed to be particularly important in the case of *Klebsiella spp.*, as we found this pathogen at least three times more frequently than in the average of 7% in other studies<sup>12,20,21</sup>. This comparatively higher rate of *Klebsiella spp.* might also indicate that a good proportion of cases of healthcare-associated infections were included in our study, thus also affecting the patterns of antimicrobial resistance we found.

Multidrug resistance to antibiotics is a public health problem worldwide<sup>13</sup>. While the early and appropriate treatment of infections is essential in improving

prognosis and reducing morbidity and mortality <sup>5</sup>, the overuse or improper use of antimicrobials, especially empirically prescribed broad-spectrum, prophylactic antibiotic therapy are factors associated with increased bacterial resistance <sup>13,17,18</sup>.

We found high rates of antimicrobial resistance in bacterial isolates and these rates changed over time, when the two periods were compared. The resistance of *E.coli* and *Klebsiella spp.* isolates to nalidixic acid increased two and three fold respectively, reaching around 50% in 2008. Unlike in studies from different settings where rates of resistance to nalidixic acid remained low over time <sup>8,19,20,25</sup>, our findings are similar to those from Central African Republic, where resistance of isolates of *Enterobacteriaceae* were monitored in adults and children with uncomplicated UTI and there was an increase from 21 to 50% in resistance between 2004 and 2006 <sup>26</sup>. The increased resistance to nalidixic acid in Brazil could be due to the very common prescription of nalidixic acid as empirical therapy for dysentery or UTI, aggravated by self-medication, as parents may easily purchase and give their children unprescribed treatment when facing symptoms they judge as similar <sup>27</sup>.

In the present study, although strains of *E.coli* and *Klebsiella spp.* showed a slightly decreased resistance to SMT-TMT, it remained high (above 60%) in the most recent period (2008). Throughout the world, since late nineties, resistance of uropathogens to SMT-TMT has been on the increase <sup>8,21,25</sup>, although these findings were not uniform <sup>20</sup>. For instance, Prais *et al* in Israel, observed a decreasing resistance (from 1991 to 1999) of strains of *E.coli* and *Klebsiella spp* to SMT-TMP reaching around 30% and 20% respectively in 1999 <sup>20</sup>. On the other hand, T-Hseng *et al* (Taipei, Taiwan) described increasing rates of resistance to SMT-TMT of *E.coli* and *Klebsiella pneumoniae* to SMT-TMT, reaching 50 and 18% respectively in 2001-2005 <sup>21</sup>. In

previous Brazilian studies, Goldraich *et al* (Porto Alegre), in febrile children under twelve years of age, found statistically significant variations in three periods (1986-89, 1990-91, 1997) for the resistance pattern of *E.coli* to SMT-TMT, which remained around 60% in 1997<sup>8</sup>. Guidoni *et al* (Sao Paulo) comparing urine cultures from children under the age of fifteen years, during 1986-1989 and 2004-2005, and observed an increasing resistance from 36% to 51%<sup>25</sup>. Like in the case of nalidixic acid, the high resistance rates to SMT-TMT in Brazil might be due to a combination of widespread use (protocols from the Ministry of Health place SMT-TMT as either the first or second drug of choice for upper respiratory tract and urinary tract infections) and self-medication<sup>27,28</sup>.

In the present study, strains of *E.coli* and *Klebsiella spp.* showed around 15% of resistance to ciprofloxacin and a significant increasing resistance of *Klebsiella spp* when comparing the two study periods. This increased resistance to ciprofloxacin among *Enterobacteriaceae* has been described elsewhere, even though the rates of resistance varied enormously from 44% in Central African Republic to only 2% in Sweden<sup>9,26</sup>. In our study, the resistance of *P. aeruginosa* to ciprofloxacin remained lower than 10%, similarly to that found by others<sup>16,29</sup>. While ciprofloxacin achieves high urinary concentrations, its use in children with UTI must be restricted to complicated cases when there is no other oral effective antimicrobial for the multi-resistant uropathogen<sup>9,25,30</sup>.

In this study, isolates of *E.coli*, *Klebsiella spp* and *P.mirabilis* showed resistance rates higher than 30% to CEF I, although the strains of *E. coli* showed a reduction of resistance between the two study periods. Bercion *et al* observed a similar pattern of evolution of resistance among ESBL non-producer enteropathogens<sup>26</sup>. Comparatively,

in Melbourne, Australia resistance to CEF I in *E.coli* isolates was around 23% in children younger than 6 years<sup>15</sup>. On the other hand, we found that strains of *E.coli* were resistant to nitrofurantoin in less than 20% in both study periods and this resistance actually decreased over time (to around 8% in 2008). This finding is in accordance with that observed by other investigators<sup>9,21,25</sup>.

As far as antibiotic coverage is concerned, ciprofloxacin or nitrofurantoin would cover most isolates, while CEF I or nalidixic acid would reach a coverage of only around 55% and SMT-TMT would only cover 35% of isolates. These resistance patterns should be interpreted with caution. The present study focused on results of urine cultures to assess trends in pathogen frequency and antimicrobial resistance. As the investigators were not able to obtain detailed data from patients to distinguish community acquired from healthcare-associated infections nor to exclude children with malformations, this is the main limitation of this retrospective study. Thus individual decisions about empiric treatment should take into account the lower / higher risk profile for resistance.

Notwithstanding, our results support the recommendation of nitrofurantoin as a possible empiric antimicrobial of choice for uncomplicated UTI in this setting, as the use of ciprofloxacin should be restricted to complicated cases due to its potential to induce resistance<sup>30</sup>. Nitrofurantoin is well absorbed from the gastrointestinal tract but reaches low plasma levels, thus its use for systemic infections is restricted. However, it is excreted in urine and is very effective in uncomplicated UTI<sup>5,31</sup>. Although nitrofurantoin is considered one of the drugs to be recommended for empirical treatment, we emphasize that the most species of *Proteus* are generally resistant to nitrofurantoin<sup>31</sup>. We also emphasize that urine cultures must be collected before

starting therapy in all cases and antibiotics adjusted according to sensitivity patterns. General trends of antimicrobial resistance should be monitored at the local level as important changes occur over time and can imply in changes in empirical treatment recommendations. Further prospective studies should address empiric antibiotic coverage according to low / high risk assessment for resistance.

### **Acknowledgements**

We would like to acknowledge Dr Iracy Araújo, Dr Alfredo Meneses and Ms Karla Pacheco for their contributions to data collection and database entry and to Dr Marcelo Pontual for critically reviewing early versions of the manuscript.

## REFERENCES

1. Schlager TA. Urinary tract infections in infants and children. *Infectious Disease Clinics of North America* 2003; 17:353-365.
2. Hoberman A, Chao HP, Keller DM, Hickey R, Davis HW, Ellis D. Prevalence of urinary tract infection in febrile infants. *The Journal of Pediatrics* 1993;123:17-23.
3. Shaw KN, Gorelick M, McGowan KL, Yakscoe NM, Schwartz JS. Prevalence of urinary tract infection in febrile young children in the emergency department. *Pediatrics* 1998; 102:1-5.
4. Hansson S, Bollgren I, Esbjörner E, Jakobsson B, Marild S. Urinary tract in children below two years of age: a quality assurance project in Sweden. *Acta Paediatric* 1999; 270-274.
5. American Academy of Pediatrics. Committee on Quality Improvement. Subcommittee on Urinary Tract Infection. Practice parameter: the diagnosis, treatment, and evaluation of the initial urinary tract infection in febrile infants and young children. *Pediatrics* 1999; 103:843-852.
6. Ransley PG, Risdon RA. Reflux nephropathy: effects of antimicrobial therapy on the evolution of the early pyelonephritic scar. *Kidney International* 1981; 20: 733-742.



7. Macedo CS, Bastos HD, Riyuzo MC. Renal scars in children with primary vesicouretral reflux. *Jornal de Pediatria* 2003; 79:355-62.
8. Goldraich NP, Manfroi A. Febrile urinary tract infection: *Escherichia coli* susceptibility to oral antimicrobials. *Pediatric Nephrology* 2002; 17:173-176.
9. Storby K.A., Österlund A, Kahlmeter G. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* in urine samples from children and adults: a 12 year analysis. *Acta Paediatrica* 2004; 93:487-491.
10. Kanellopoulos TA, Salakos C, Spiliopoulou I, Ellina A, Nikolapoulou NM, Papanastasiou DA. First urinary tract infection in neonates, infants and young children: a comparative study. *Pediatric Nephrology* 2006; 21:1131-1137.
11. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP, National Nosocomial Infections Surveillance System. Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States. *Pediatrics* 1999;103:39-46.
12. Prelog M, Schiefecker D, Fille M, Wurzner R, Brunner A, Zimmerhackl LB. Febrile urinary tract infection in children: ampicillin and trimethoprim insufficient as empirical mono-therapy. *Pediatric Nephrology* 2008; 23:597-602.
13. Shlaes DM, Gerding DN, John JrJF, Craig WA, Bornstein DL, Duncan RA, et al. Society for healthcare epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the prevention of antimicrobial resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1997; 18:275-91.

14. Wu CY, Chiu PC, Hsieh KS, Chiu CL, Shih CH, Chiou YH. Childhood urinary tract infection: a clinical analysis of 597 cases. *Acta Paediatric Taiwan* 2004; 45:328-333.
15. Mehr SS, Powell CVE, Curtis N. Cephalosporin resistant urinary tract infections in young children. *J. Paediatric Child Health* 2004; 40:48-52.
16. Haller M, Brandis M, Berner R. Antibiotic resistance of urinary tract pathogens and rationale for empirical intravenous therapy. *Pediatric Nephrology* 2004; 19: 982-86.
17. Conway PH, Cnaan A, Zaoutis T, Henry BV, Grundmeier RW, Keren R. Recurrent urinary tract infection in children: risk factors and association with prophylactic antimicrobials. *JAMA* 2007; 298:179-186.
18. Allen UD, MacDonald N, Fuite L, Chan F, Stephens D. Risk factors for resistance to "first-line" antimicrobials among urinary tract isolates of *Escherichia coli* in children. *Canadian Medical Association* 1999; 160:1436-40.
19. Kiffer CR, Mendes C, Oplustil CP, Sampaio JL. Antibiotic resistance and trend of urinary pathogens in general outpatients from major urban city. *International Brazilian Journal of Urology* 2007; 33:42-9.
20. Prais D, Straussberg R, Avitzur Y, Nussinovitch M, Harel L, Amir J. Bacterial susceptibility to oral antibiotics in community acquired urinary tract infection. *Archives Diseases Children* 2003; 88: 215-218

21. Tseng M-H, Lo WT, Lin WJ, Teng C-S, Chu M-L, Wang C-C. Changing trend in antimicrobial resistance of pediatric uropathogens in Taiwan. *Pediatrics International* 2008; 50: 797-800
22. Sotto A, Boever CM, Fabro-Peray P, Gouby A, Sirot D, Jourdan J. Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with urinary tract infections: a prospective study. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;438-44.
23. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition
24. ANVISA (s.d.) [www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/manuais.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/manuais.htm) Acesso em 28 de julho de 2008, disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Manual de microbiologia clínica para controle de infecção em serviços de saúde.
25. Guidoni EBM, Berezin EN, Nigro S, Santiago NA, Benino V, Toporovski J. Antibiotic resistance patterns of pediatric community-acquired urinary infections. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2008;12: 321-323
26. Bercion R, Mossoro-Kpinde D, Manirakiza A, Faou AL. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* uropathogens in Bangui, Central African Republic . *Journal Infection Developing Countries* 2009; 3: 187-190.
27. Manual Integrado da Prevenção e Controle de doenças transmitidas por alimentos. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.
28. MINISTÉRIO DA SAÚDE I - Atenção Integrada às Doenças Prevalentes na Infância. Curso de Capacitação.Tratar a Criança - Módulo 4 2.<sup>a</sup> edição revista -

1ª reimpressão; Série F. Comunicação e Educação em Saúde Brasília – DF  
2003.

29. Marcus N, Ashkenazi S, Samra Z, Cohen A, Livni G. Community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections in children hospitalized in a tertiary center: relative frequency, risk factors, antimicrobial resistance and treatment. *Infection* 2008; 36:421-426.
30. Committee on Infectious Diseases. The use of systemic fluoroquinolones. *Pediatrics* 2006; 118: 1287-1292.
31. Gupta K. Emerging antibiotic resistance in urinary tract pathogens. *Infectious Disease Clinics of North America* 2003; 17: 243-259.

Table 1 – Positive urine cultures and distribution of microorganisms isolated by age group and gender from 1999-2001 and 2008 periods at IMIP<sup>&</sup>

	Neonates and infants					Children > 24 ≤ 60 months				
	total	Male n (%)	95% CI	Female n (%)	95% CI	total	Male n (%)	95% CI	Female n (%)	95% CI
<b>Urine cultures</b>										
Total urine cultures	2138	1139 (100)		999 (100)		1975	942 (100)		1033(100)	
Positive culture (%)	345	199 (17.5)	15.3-19.8	146 (14.6)	12.5-17.0	256	101 (10.7)*	8.9-12.9	155(15.0)*	12.9-17.4
<b>Microorganism isolated</b>										
<b>GRAM NEGATIVE</b>										
• <i>Escherichia coli</i>	114 (33.0)	52 (26.1)*	20.2-32.8	62 (42.5)*	34.3-50.9	96(37.5)	20 (19.8)*	12.5-28.9	76 (49.0)*	49.9-57.2
• <i>Klebsiella spp.</i>	103 (29.0)	55 (27.6)	21.5-34.4	48 (32.9)	25.3-41.1	53(20.7)	19 (18.8)	11.7-27.8	34 (21.9)	15.7-29.3
• <i>P.aeruginosa</i>	21 (6.1)	15 (7.5)	4.3-12.1	6 (4.1)	1.5-8.7	22 (8.6)	11 (10.9)	5.6-18.7	11 (7.1)	3.6-12.3
• <i>Proteus mirabilis</i>	21 (6.1)	16 (8.0)	4.7-12.7	5 (3.4)	1.1-7.8	19 (7.4)	14 (13.9)*	7.8-22.2	5 (3.2)*	1.1-7.4
• Others	33 (9.6)	19 (9.5)	5.8-14.5	14 (9.6)	5.3-15.6	22 (8.6)	13 (12.9)*	7.0-21.0	9 (5.8)*	2.7-10.7
<b>GRAM POSITIVE</b>	22 (6.4)	15 (7.5)	4.3-12.1	7 (4.8)	1.9-9.6	30(11.7)	17 (16.8)*	10.1-25.6	13 (8.4)*	4.5-13.9
<b>FUNGI</b>										
• <i>Candida sp</i>	31 (8.9)	27 (13.6)*	9.1-19.1	4 (2.7)*	0.8-8.7	14 (5.5)	7 (6.9)	2.8-13.8	7 (4.5)	1.8- 9.1
<b>Total of isolates</b>		199 (100)		146 (100)			101 (100)		155 (100)	

& IMIP = Instituto Medicina Integral Professor Fernando Figueira

\* p<0.05 for the difference between the gender for the same age group

Table 2 – Positive urine cultures and distribution of microorganisms isolated by two periods (1999-2001 and 2008) at IMIP<sup>&</sup>.

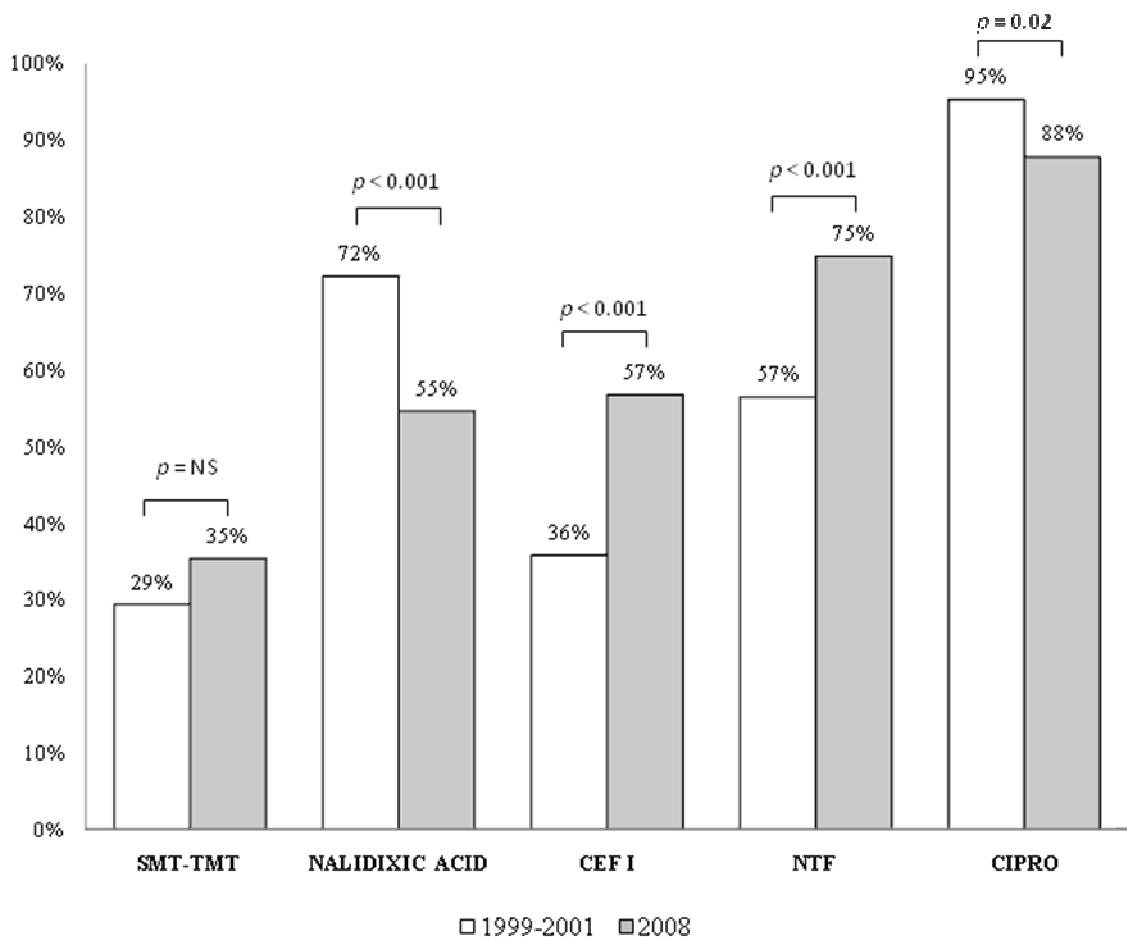
	1999 – 2001		2008		<b>Total</b> n (%)
	n (%)	95% IC	n (%)	95% IC	
<b>Urine cultures</b>					
Total urine cultures	1622 (100)		2491 (100)		4113 (100)
Positive culture (%)	323 (19.9)	18-22	278 (11.2)	10-12.5	601 (14.6)
<b>Microorganisms isolated</b>					
<b>GRAM NEGATIVE</b>					
▪ <i>Escherichia coli</i>	97 (30.0)*	25.1-35.4	113 (40.6)*	34.8-46.7	210 (34.9)
▪ <i>Klebsiella spp.</i>	88 (27.2)	22.5-32.5	68 (24.5)	19.5-30.0	156 (25.9)
▪ <i>P.aeruginosa</i>	17 (5.3)*	3.2-8.5	26 (9.4)*	6.2-13.4	43 (7.2)
▪ <i>Proteus mirabilis</i>	21 (6.5)	4.2-9.9	19 (6.8)	4.2-10.5	40 (6.7)
▪ Others	33 (10.2)	7.2-14.2	22 (7.9)	5.0-11.7	55 (9.2)
GRAM POSITIVE	33 (10.2)	7.2-14.2	19 (6.8)	4.2-10.5	52 (8.7)
<b>FUNGI</b>					
▪ <i>Candida spp.</i>	34 (10.5)*	7.4-14.5	11 (4.0)*	2.0-7.0	45 (7.5)
<b>Total of isolates</b>	323 (100)		278 (100)		601 (100)

& IMIP = Instituto Medicina Integral Professor Fernando Figueira \* p<0.05 for the difference between the two periods

Table 3 – Antimicrobial Resistance of urinary pathogens in children less than five years in two periods (1999-2001 and 2008) at IMIP<sup>&</sup>.

	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella spp.</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>Proteus mirabilis</i>	
	1999-2001	2008	1999-2001	2008	1999-2001	2008	1999-2001	2008
Total	97	113	88	68	17	26	21	19
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Nalidixic acid	97 (23.7)*	112 (51.8)*	88 (15.9)*	65(47.7)*	17 (94.1)	-	21 (19)	18 (16.7)
Amicacine	92 (16.3)*	112 (1.8)*	88 (21.6)	68 (10.3)	16 (25.0)*	26 (3.8)*	21 (23.8)*	19 (0)*
CEF I <sup>†</sup>	92 (61.9)*	108 (31.5)*	87 (64.4)	66 (59.0)	16 (100)	-	21 (42.9)	18 (38.9)
CEF III <sup>†</sup>	41 (7.3)	33 (21.2)	54 (48.1)	33 (57.6)	11 (36.4)*	25 (0)*	4 (25)	6 (0)
Ciprofloxacin	46 (4.3)	113 (15.0)	52 (1.9)*	67 (14.9)*	5 (0)	26 (7.7)	8 (0)	18 (0)
Gentamicin	92 (29.3)*	109 (16.5)*	84 (47.6)	64 (28.0)	17 (47.1)*	26 (3.8)*	20 (30)	19 (15.8)
Meropenem	57 (0)	33 (0)	57 (1.8)	33 (0)	12 (0)	24 (0)	8 (12.5)	6 (0)
Nitrofurantoin	97 (19.6)*	112 (8.0)*	87 (45.9)	66 (39.4)	16 (100)	1	21 (90.5)	19 (73.7)
Pip+ taz <sup>†</sup>	1	34 (2.9)	-	33 (6.0)	-	24 (0)	-	6 (0)
SXT <sup>†</sup>	91 (78)	112 (68.8)	85 (70.6)	67 (61.2)	16 (100)	26 (100)	21 (61.9)	19 (31.6)

<sup>†</sup> CEF I Cephalothin, CEF III ceftriaxone except for *Pseudomonas* ceftazidime , Pip + Taz Piperacillin/ tazobactam, SXT trimethoprim/sulfamethoxazole; & IMIP = Instituto Medicina Integral Professor Fernando Figueira; \* differences in antibiotic resistance between the two periods p<0.05



**Figure 1-** Comparison of the coverage of urinary pathogen isolates of co-trimoxazole (SMT-TMT), nalidixic acid, first generation cephalosporin (CEF I), nitrofurantoin (NTF) and ciprofloxacin (CIPRO). *P* values show differences between the two study periods.



## VI. Considerações Finais

Após avaliação do perfil de resistência *in vitro* aos antimicrobianos dos uropatógenos, foi verificada nos dois períodos do estudo (1999/2001 e 2008) um aumento da resistência da *E.coli* e da *Klebsiella spp.* ao ácido nalidíxico além da persistência da resistência bacteriana ao sulfametoxazol – trimetoprim e à cefalosporina de primeira geração. O estudo foi realizado no IMIP, por ser um hospital de referência, pode gerar um viés com um aumento da resistência aos antimicrobianos na população estudada.

Estes achados são importantes para nortear a antibioticoterapia empírica efetiva para tratamento das ITU, uma vez que esta afecção pode determinar hipertensão arterial sistêmica, cicatrizes renais e DRCT, quando não tratada adequadamente.

Baseados nos resultados das uroculturas realizadas em 2008, a nitrofurantoína ou o ciprofloxacino seriam efetivos em aproximadamente 88% das cepas isoladas, CEF I ou ácido nalidíxico em torno de 55% e SMT-TMP em torno de 35%.

Estes resultados devem ser interpretados com cautela uma vez que este estudo avaliou retrospectivamente o resultado das uroculturas, sem acesso à história clínica para determinar a presença de fatores associados ao isolamento de micro-organismos multirresistentes.

A mudança no perfil de resistência aos antimicrobianos deve ser monitorada, pois mudanças importantes foram observadas nos últimos anos. Estudos prospectivos devem ser realizados para acompanhar as mudanças do perfil de resistência dos uropatógenos em crianças. Isto pode auxiliar na prevenção do uso inadequado de

antibioticoterapia para tratamento da ITU, reduzindo provavelmente o aumento de sua resistência e com isso evitar, de forma indireta o aparecimento de suas complicações.

Ressalta-se que a terapia empírica, baseada em dados epidemiológicos, deve sempre ser ajustada após resultado da urocultura coletada antes do início do tratamento do paciente com ITU.

## VII. Referências Bibliográficas

- 01.** American Academy of Pediatrics. Committee on Quality Improvement. Subcommittee on Urinary Tract Infection. Practice parameter: the diagnosis, treatment, and evaluation of the initial urinary tract infection in febrile infants and young children. *Pediatrics* 1999; 103:843-852.
- 02.** Schlager TA. Urinary tract infections in infants and children. *Infectious Disease Clinics of North America* 2003; 17:353-365.
- 03.** Larcombe J. Clinical evidence: urinary tract infection in children. *BMJ* 1999; 319:1173-1175.
- 04.** Ransley PG, Risdon RA. Reflux nephropathy: effects of antimicrobial therapy on the evolution of the early pyelonephritic scar. *Kidney International* 1981; 20: 733-742.
- 05.** Zorc JJ, Kidoo D, Shaw KN. Diagnosis and management of pediatric urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 18:417-422.
- 06.** Shlaes DM, Gerding DN, John JrJF, Craig WA, Bornstein DL, Ducan RA, et al. Society for healthcare epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the prevention of antimicrobial resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1997; 18:275-91.

- 07.** Sharifian M, Karimi A, Tabatabaei SR, Anvaripour N. Microbial sensitivity pattern in urinary tract infections in children: a single center experience of 1.177 urine cultures. *Jpn. J. Infecion Disease* 2006; 59:380-82.
- 08.** Wu CY, Chiu PC, Hsieh KS, Chiu CL, Shih CH, Chiou YH. Childhood urinary tract infection: a clinical analysis of 597 cases. *Acta Peadiatric Taiwan* 2004; 45:328-333.
- 09.** Ma JF, Shortliffe LMD. Urinary tract infection in children: etiology and epidemiology. *Urologic Clinics of North America* 2004; 31:517-526.
- 10.** Jakobsson B, Esbjörner E, Hansson S. Minimum incidence and diagnostic rate of first urinary tract infection. *Pediatrics* 1999; 104:222-226.
- 11.** Shaw KN, Gorelick M, McGowan KL, Yakscoe NM, Schwartz JS. Prevalence of urinary tract infection in febrile young children in the emergency department. *Pediatrics* 1998; 102:1-5.
- 12.** Alper BS, Curry SH. Urinary tract infection in children. *American Academy of Family Physicians* 2005: 2483-2488.
- 13.** Macedo CS, Bastos HD, Riyuzo MC. Renal scars in children with primary vesicouretral reflux. *Jornal de Pediatria* 2003; 79:355-62.
- 14.** Hasson S, Bollgren I, Esbjörner E, Jakobsson B, Marild S. Urinary tract infections in children bellow two years of age: a quality assurance project in Sweden. *Acta Peadiatric* 1999; 88:270-4.

15. Hoberman A, Chao HP, Keller DM, Hickey R, Davis HW, Ellis D. Prevalence of urinary tract infection in febrile infants. *The Journal of Pediatrics* 1993;123:17-23.
16. Conway PH, Cnaan A, Zaoutis T, Henry BV, Grundmeier RW, Keren R. Recurrent urinary tract infection in children: risk factors and association with prophylactic antimicrobials. *JAMA* 2007; 298:179-186.
17. Musa-Aisien AS, Ibadin OM, Ukoh G, Akpede GO. (2003). Prevalence and antimicrobial sensitivity pattern in urinary tract infection in febrile under-5s at a children's emergency unit in Nigeria. *Annals of Tropical Paediatrics* , 23, 39-45.
18. Lin DS, Huang SH, Lin CC, Tung YC, Huang TT, Chiu NC, et al. Urinary tract infection in febrile infants younger than eight weeks of age. *Pediatrics* 2000; 105: 1-4.
19. Kiffer CR, Mendes C, Oplustil CP, Sampaio JL. Antibiotic resistance and trend of urinary pathogens in general outpatients from major urban city. *International Brazilian Journal of Urology* 2007; 33:42-9.
20. Goldraich NP, Manfroi A. Febrile urinary tract infection: *Escherichia coli* susceptibility to oral antimicrobials. *Pediatric Nephrology* 2002; 17:173-176.
21. Kanellopoulos TA, Salakos C, Spiliopoulou I, Ellina A, Nikolapoulou NM, Papanastasiou DA. First urinary tract infection in neonates, infants and young children: a comparative study. *Pediatric Nephrology* 2006; 21:1131-1137.
22. Orellana PB, Cavagnaro FSM, Banquedano PD, Lagomarsino EF, García CB, Villaruel L, et al. Factores de riesgo de daño renal permanente en niños con infección del tracto urinario. *Revista Médica de Chile* 2002; 130:1147-1153.

- 23.** Smellie JM, Prescod NP, Shaw PJ, Risdon RA, Bryant TN. Childhood reflux and urinary infection: a follow up of 10-41 years in 226 adults. *Pediatric Nephrology* 1998; 12:727-736.
- 24.** Warady A.B, Chadha V. Chronic kidney disease in children: the global perspective. *Pediatric Nephrology* 2007; 22:1999-2009.
- 25.** SBN. [www.sbn.org.br](http://www.sbn.org.br) Acesso em 03 de março de 2010 em Censo ano 2008.
- 26.** Storby K.A., Österlund A, Kahlmeter G. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* in urine samples from children and adults: a 12 year analysis. *Acta Paediatrica* 2004; 93:487-491.
- 27.** Schlager TA. Urinary Tract Infections in children younger than 5 years of age. Epidemiology, diagnosis, treatment, outcomes and prevention. *Paediatric Drugs* 2001; 3:219-227.
- 28.** Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP, National Nosocomial Infections Surveillance System. Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States. *Pediatrics* 1999;103:39-46.
- 29.** CDC. (s.d.). [www.cdc.gov/nicdod/aip/research/ar.html](http://www.cdc.gov/nicdod/aip/research/ar.html). Acesso em 07 de agosto de 2008, disponível em: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)
- 30.** Tavares, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2000; 33(3): 281-301.

- 31.** Sotto A, Boever CM, Fabro-Peray P, Gouby A, Sirot D, Jourdan J. Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with urinary tract infections: a prospective study. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;438-44.
- 32.** Allen UD, MacDonald N, Fuite L, Chan F, Stephens D. Risk factors for resistance to "first-line" antimicrobials among urinary tract isolates of *Escherichia coli* in children. *Canadian Medical Association* 1999; 160:1436-40.
- 33.** Marcus N, Ashkenazi S, Samra Z, Cohen A, Livni G. Community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections in children hospitalized in a tertiary center: relative frequency, risk factors, antimicrobial resistance and treatment. *Infection* 2008; 36:421-426.
- 34.** Bistori M, Maraki S, Kalmanti M, Galanakis E. Resistance against broad-spectrum  $\beta$ -lactams among uropathogens in children. *Pediatric Nephrology* 2009; 24:2381-2386.
- 35.** Prelog M, Schiefecker D, Fille M, Wurzner R, Brunner A, Zimmerhackl LB. Febrile urinary tract infection in children: ampicillin and trimethoprim insufficient as empirical mono-therapy. *Pediatric Nephrology* 2008; 23:597-602.
- 36.** Mehr SS, Powell CVE, Curtis N. Cephalosporin resistant urinary tract infections in young children. *J. Paediatric Child Health* 2004; 40:48-52.
- 37.** Haller M, Brandis M, Berner R. Antibiotic resistance of urinary tract pathogens and rationale for empirical intravenous therapy. *Pediatric Nephrology* 2004; 19: 982-86.

38. Akram M, Shahid M, Khan AU. Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in JNMC Hospital Aligarh, India. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2007; 6:4.
39. Bercion R, Mossoro-Kpinde D, Manirakiza A, Faou AL. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* uropathogens in Bangui, Central African Republic . *Journal Infection Developing Countries* 2009; 3: 187-190.
40. ANVISA (s.d.) [www.anvisa.gov.br/servicos/controle/manuais.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/manuais.htm) Acesso em 28 de julho de 2008, disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Manual de microbiologia clínica para controle de infecção em serviços de saúde.
41. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition
42. Brasil. Ministério Nacional da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. *Bioética* 1996; 4:S15-S25



## VIII. Apêndices

Apêndice 1
------------

### UROPATÓGENOS EM CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS: ALTERAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA NO PERÍODO DE DEZ ANOS

#### LISTA DE CHECAGEM

Nome \_\_\_\_\_

Registro

#### 1.CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

Todos os pacientes com idade entre zero e cinco anos que coletaram urocultura 1.  Sim 2.  Não

#### 2.CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

Amostras repetidas do mesmo paciente com intervalo de 30 dias com isolamento do mesmo agente etiológico 1.  Sim 2.  Não

Urocultura com isolamento de único patógeno com contagem  $< 10^5$  UFC/ cm<sup>3</sup> ou crescimento polimicrobiano independente da contagem de colônias 1.  Sim 2.  Não

#### 3.CONCLUSÃO

Elegível

Não elegível

Apêndice 2

ETIQUETA

FORMULÁRIO DA PESQUISA:

TÍTULO: “Uropatógenos em crianças menores de cinco anos: alteração do perfil de resistência no período de dez anos.”

(Mês, ano e número do formulário)

Número do formulário:

Pesquisador \_\_\_\_\_

Local \_\_\_\_\_

Data da coleta de dados \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Data da 1ª. Revisão \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data da Digitação \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data da 2ª. Revisão \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data da 3ª. Revisão \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**I. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS**

Idade (meses)

Sexo 1.  Masculino

2.  Feminino

## II. CARACTERÍSTICAS DE ORIGEM

- Ambulatório de Pediatria Geral .1
- Ambulatório de Nefrologia .2
- Hospital .3

## III. SETOR DO HOSPITAL:

- Enfermaria de Pediatria 1
- UTI Pediátrica 2
- Oncologia Pediátrica 3
- Unidade Renal 4
- Unidade Neonatal 5
- Emergência 6

## IV. CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS:

Micro-organismo isolado: \_\_\_\_\_

- Urocultura Positiva UFC/ ml 1.  Sim 2.  Não
- 50.000UFC/ ml
- 60.000UFC/ml
- 70.000UFC/ml
- 80.000UFC/ml
- 90.000UFC/ml
- 100.000UFC/ml

$\geq 100.000$ UFC/ml

Só semeio

#### VI. CARACTERÍSTICAS DO TESTE DE SENSIBILIDADE:

Ciprofloxacino 1.  Sensível 2.  Resistente 3.  Não testado

Acido nalidíxico 1.  Sensível 2.  Resistente 3.  Não testado

Nitrofurantoína 1.  Sensível 2.  Resistente 3.  Não testado

Gentamicina 1.  Sensível 2.  Resistente 3.  Não testado

Amicacina 1.  Sensível 2.  Resistente 3.  Não testado

Oxacilina 1.  Sensível 2.  Resistente 3.  Não testado

Cefalotina 1.  Sensível 2.  Resistente 3.  Não testado

Ceftriaxona 1.  Sensível 2.  Resistente 3.  Não testado

Ceftazidime 1.  Sensível 2.  Resistente 3.  Não testado

Vancomicina 1.  Sensível 2.  Resistente 3.  Não testado

Sulfametoxazol – trimetoprim 1.  Sensível 2.  Resistente 3.  Não testado

Piperacilina – tazobactan 1.  Sensível 2.  Resistente 3.  Não testado

Meropeném 1.  Sensível 2.  Resistente 3.  Não testado

## **IX. Anexos**

### **Instructions for Authors**

#### **Pediatric Nephrology**

##### **1 General**

Pediatric Nephrology will consider the publication of any original manuscript that deals with either clinical or laboratory investigations of relevance to the broad field of pediatric nephrology. Animal and in vitro research will be considered as long as it is pertinent to normal or abnormal human renal biology. Submission of manuscripts dealing with diverse topics and problems (normal and abnormal developmental renal physiology, immunology, morphology, experimental renal disease, clinical nephrology etc.) is encouraged. All manuscripts are subject to peer review.

##### **2 Legal requirements**

All manuscripts must be contributed solely to Pediatric Nephrology and not be under consideration for publication elsewhere. All studies must be documented completely by reference to the literature and a thorough description of the experimental methods. Substantive portions of any manuscript must not have been published elsewhere except in abstract form.

Authors wishing to include figures or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

A "Copyright Transfer Statement" must be signed by the corresponding author and accompany each submission. The signatures of all contributing authors are required either on the Copyright form or on the Consent of authorship form. Both forms are available online at [springer.com/00467](http://springer.com/00467) or on our welcome page at ManuscriptCentral.

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki. It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted. Masking of the eye region is not considered adequate protection.

Studies involving animals must have the approval of the animal ethics committee of the institution and be conducted in accordance with standards such as the NIH Guide to the Care and Use of Laboratory Animals. The manuscript should contain a statement to this effect.

- [springer.com/00467](http://springer.com/00467)

### 3 Editorial procedure

Manuscripts must be written in English. Authors are urged to seek assistance if they are not writing in their native language. Pediatric Nephrology is a signatory journal to the "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" issued by the International Committee for Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org>).

- Rapid communications of high scientific importance are accepted for accelerated review and publication. Clear concise reporting is highly desirable; figures should be avoided, if possible.

A manuscript not accepted as a Rapid communication may be considered for publication as an original article.

- Brief reports of no more than 1500 words pertaining to clinical or laboratory topics will be considered for publication. These submissions should be organized and prepared in the same manner as a full-length manuscript but should cite no more than 12–15 references and contain no more than one figure or table.

- Editorial commentaries provide information and discussion on new findings and current questions. Editorial Commentaries generally span 3–5 printed pages including possible figures and a list of approximately 20 key references. However, exceptions will be accepted if worthwhile. One journal page is equivalent to 2.5 double-spaced, typed, A4-size pages.

- Reviews provide a comprehensive overview of state-of-the-art knowledge in a defined area and emphasize new questions, conceptions and future research directions. Reviews are generally limited to 8 printed pages, including figures, tables and references.

- Letters to the editors must be brief as possible and not contain more than one figure or table.

- Book reviews should be submitted to

John D. Mahan, M.D.

Department of Pediatrics

Division of Pediatric Nephrology

The Ohio State University COMPH

Columbus, OH 43205, USA

e-mail: [MahanJ@pediatrics.ohio-state.edu](mailto:MahanJ@pediatrics.ohio-state.edu)

Fax: +1-614-7226132

#### 4 Manuscript preparation

Manuscripts should be arranged in the following order: Title page, abstract, key words, introduction, methods, results, discussion, acknowledgements, references, tables, figure legends, figures.

- Title page. The title should not exceed 90 characters and should not contain abbreviations. At the discretion of the editors, an exception to this rule may be granted, in which case the abbreviation must be defined in the first sentence of the abstract. The title page should contain the full names of all authors and complete contact information of the corresponding author.
- Abstract. An abstract of no more than 200 words in length should accompany each manuscript, describing precisely what was done, the results that were obtained, and the conclusions drawn. It must be acceptable for use without revision by abstracting journals.
- Keywords. Five to seven key words, preferably terms not used in the title, should be supplied following the abstract.
- Length of paper. Concise reporting is encouraged.
- Abbreviations, nomenclature, and symbols. Abbreviations should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter. Generic names should be indicated for all drugs; use of the proprietary name is permissible only when the generic name has been used first.
- Measurement units. Laboratory values should be described in metric mass units. The international system of units (SI units) can be provided in parentheses immediately after metric units.
- Footnotes. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lowercase letters (or asterisks for significance values and other stylistic data).
- References. References should be numbered consecutively in order of their appearance in the text and listed in numerical order. Journal titles should be abbreviated according to the Index Medicus.

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication ("in press"). Personal communications or unpublished data cannot be included in the reference list, but they should be mentioned in the text in parentheses including a date. Permission must be submitted when citing a personal communication.

References with correct punctuation should be styled as follows:

Journals:

Halevy R, Smolkin V, Bykov S, Chervinsky L, Sakran W, Koren A (2004) Power Doppler ultrasonography in the diagnosis of acute childhood pyelonephritis. *Pediatr Nephrol* 19:987-991

Books:

Grindley MF (1968) Manual of histologic and special staining techniques, 2nd edn. Blakiston, New York, pp 47-48

A paper published online but not (yet) in print can be cited using the Digital Object Identifier (DOI). The DOI should be added at the end of the reference in question.

Example: Davin JC, Merkus MP (2004) Levamisole in steroid-sensitive nephrotic syndrome of childhood: the lost paradise? *Pediatr Nephrol* DOI 10.1007/s00467-004-1615-9

■ Illustrations and tables. All figures and tables should be cited in the text and each numbered consecutively throughout. Lowercase letters should be used to identify figure parts. If illustrations are supplied with uppercase labeling, lowercase letters will still be used in the figure legends and citations. Lettering should be large enough to

withstand any reduction necessary to conform to the journal format. Figures will be adjusted to match either column width (8.6 cm) or page width (17.6 cm) or to be 13.1 cm in width with the legend at the side. The maximum length is 23.6 cm including legend.

■ Figure legends. Figure legends should be written on a separate page and should not be included in the figure file. They must be brief, include any magnifications and not repeat information given in the text.

■ Tables. Tables should have a title and a legend explaining any abbreviation used in that table. Footnotes to tables should be indicated by superscript lowercase letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

■ Color illustrations. Color illustrations will be accepted; however, publication will only be free of charge to the authors if the use of color is scientifically justified.

## 5 Submission

All manuscripts must be submitted online. You may either use the link on the journal's homepage or log directly onto the site

<http://mc.manuscriptcentral.com/pedneph>

and upload your manuscript following the on-screen instructions.

Electronic submission substantially reduces editorial processing and shortens reviewing and overall publication times. All manuscripts are subject to copy editing.

Assistance is available from the Pediatric Nephrology editorial offices:

Otto Mehls, M.D., Editor

Pamela Okun, Ph.D., Managing Editor

Division of Pediatric Nephrology



University Children's Hospital

Im Neuenheimer Feld 150

69120 Heidelberg, Germany

e-mail: [pediatric.nephrology@med.uni-heidelberg.de](mailto:pediatric.nephrology@med.uni-heidelberg.de)

Tel.: +49-6221-564503

Fax: +49-6221-564501

Michel Baum, M.D., Editor

Linda Bridges-Halcomb, Managing Editor

Division of Pediatric Nephrology

University of Texas Southwestern Medical Center

5323 Harry Hines Boulevard

Dallas, TX 75390-9063, USA

e-mail: [pediatric-nephrology@utsouthwestern.edu](mailto:pediatric-nephrology@utsouthwestern.edu)

Tel.: +1-214-6483438

Fax: +1-214-6482034

■ **Text.** To help you prepare your manuscript, Springer offers a template that can be used with Winword 7 (Windows 95), 97, 2000 and Word for Macintosh. The template is available via browser at <ftp://ftp.springer.de/pub/Word/journals>.

■ **Illustrations.** The preferred figure formats are EPS for vector graphics exported from a drawing program and TIFF for halftone illustrations. EPS files must always contain a preview in TIFF of the figure. The file name (one file for each figure) should include the figure numbers. Legends should not be included in the figure file.

**Scan resolution:** Scanned line drawings should be digitized with a minimum resolution of 800 dpi relative to the final figure size. For digital halftones, 300 dpi is usually sufficient.

**Color illustrations:** Store color illustrations as RGB (8 bits per channel) in TIFF format.

**Vector graphics:** Fonts used in the vector graphic must be included. Please do not draw with hairlines. The minimum line width is 0.2 mm (i.e., 0.567pt) relative to the final size.

**6 Open Choice Publication**

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice, whereby articles receive all the benefits of a regular subscription-based article but in addition are made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit the link below to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will be published as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for articles already published.

- Springer Open Choice

## 7 Proofreading

Authors should make their proof corrections on a printout of the pdf file supplied, checking that the text is complete and that all tables and figures have been included. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article. The author is entitled to formal corrections only. Substantial changes in content, e.g. new results, corrected values, title and authorship are not allowed without approval of the responsible editor.

## 8 Free copies, Offprints

Two complimentary copies are supplied. Orders for offprints can be placed by returning the order form with the corrected proofs.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)